动 物 学 研 究 2001, Feb. 22 (1): 20~26 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

飞蝗总 DNA 的抽提及其 RAPD 分析条件的摸索

张民照 康 乐[①]
(中国科学院动物研究所 北京 100080)

摘要：通过试验寻求得到一种快速、简便抽提飞蝗（*Locusta* sp.）总 DNA 的方法，使每头雄性和雌性成虫分别可以得到 50 和 100 μg 的总 DNA。所得到的总 DNA OD_{260}/OD_{280}为 1.5~2.2，分子量 45 kb。为了获得高分子量的 DNA 产品，使 RPAD 结果具重复性，酚氯仿抽提后的 DNA 沉淀用灭菌 Tip 头挑出，而不用离心收集。对各种分析条件如模板、Taq 酶、dNTP 及引物的浓度、不同的 PCR 仪、反应管进行了比较试验，发现在一定的范围内，它们对 RAPD 结果影响不大。用优化的试验条件对我国 3 个飞蝗亚种 5 个地理种群进行 RAPD 分析，结果在 3 个亚种 UPGMA 聚类图中，东亚飞蝗和西藏飞蝗的 2 个种群以 100% Bootstrap 分别聚类在一起，亚洲飞蝗与东亚飞蝗的 2 个种群以 66% 的 Bootstrap 聚类在一起。在 3 个亚种所有个体的 UPGMA 聚类图中，亚种内的所有个体都聚类在一起，各自形成独立分支，说明 3 个飞蝗亚种有明显的区别。西藏飞蝗的 2 个种群之间、群居型与散居型东亚飞蝗之间在聚类图中混合聚类，说明它们之间存在基因交流。

关键词：飞蝗；DNA 提取；RAPD 优化；种群遗传
中图分类号：Q969.26⁺5.2 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2001)01-0020-07

飞蝗广泛地分布在东半球，全世界已定名的有 9 个亚种（康乐等，1991）。我国飞蝗有 3 个亚种：东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*、亚洲飞蝗 *L. m. migratoria* 和西藏飞蝗 *L. m. tibetensis*。西藏飞蝗分布于西藏和青海省部分地区；亚洲飞蝗分布于新疆、内蒙古和东北等地区；而东亚飞蝗则广泛分布于我国东部和中部的地区（康乐等，1989）。

RAPD 是 Williams *et al*.(1990)和 Welsh *et al*.(1990) 同时发明的一种 DNA 分子水平上的检测技术。具有简单、快速和试验费用较低等优点。但是 RAPD 仍存在一些问题（Black，1993），主要是某些反应条件稍微改变就会影响到试验结果(陈永久等,1997;汪小全等,1996;Williams *et al*.,1993),不同实验室之间难以重复研究结果。在昆虫学研究领域，RAPD 技术已应用于昆虫种、株系、生物型以及父系的鉴定，连锁图谱的构建、系统演化，种群遗传学、杂交带的确定等。为了研究我国散居型飞蝗不同地理种群 DNA 多型性，确定 3 个飞蝗亚种的进化、起源关系，我们用 RAPD 技术，在优化条件下初步分析飞蝗种群及亚种间的亲缘关系。试图摸索出一套抽提飞蝗总 DNA 的快速、简便的方法，对影响 RAPD 分析结果的某些因素进行了试验。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验所用飞蝗均采集于田间，群居型和散居型的东亚飞蝗采集于天津北大港。亚洲飞蝗采集于内蒙巴彦淖尔盟（简称“巴盟”）乌拉特前旗。西藏飞蝗采集于西藏拉萨、日喀则。每地理种群取 10 头个体用于 RAPD 分析。

1.2 总 DNA 的抽提

参照 Cooper *et al*.(1993)方法加以改进:低温冻结活虫,去其胸翅,体表酒精灯火焰灭菌 3~5 s 后,去除内脏。每头加 5~10 mL 4℃预冷的研磨液[0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L EDTA(pH8.0),0.3 mol/L TrisHCl(pH8.0),1%SDS]磨细。加蛋白酶 K 至 50 μg/mL,37℃过夜。酚氯仿抽提离心上清液，冷冻异丙醇和 NaAc 室温下沉淀 DNA,灭菌 Tip 头挑出沉淀,70%乙醇洗涤,稍干后溶于去离子水中。

收稿日期：2000-05-17；修改稿收到日期：2000-08-01
基金项目：国家基金委重点项目（39430030）
①通讯作者（E-mail：lkang@panda.ioz.ac.cn）

加RNA酶至10 μg/mL，37℃ 2～3 h。2次酚氯仿、1次氯仿、1次无水乙醚抽提，冷冻无水乙醇和NaAc室温下沉淀，用灭菌Tip头将沉淀挑出，70%乙醇洗涤3次，稍干燥沉淀，溶于去离子水中。稀释后的模板在4℃下贮存使用。

1.3 引　物

采用美国Operon公司生产的10 Mer随机引物。

1.4 PCR反应条件

本试验中，RAPD反应条件是：总反应体积为25 μL，其中含有2.0 mmol/L $MgCl_2$，dNTP 0.1 mmol/L（Promega产品），引物0.2 μmol/L，1 U Taq酶（北农大产品，Taq酶Buffer成分未公开），20 ng模板DNA，每反应管加2滴矿物油（Sigma产品）。每个反应为45个循环，每个循环包括在循环之前94℃预变性4 min，然后94℃ 1 min，36℃ 1 min，72℃ 2 min，45个循环，72℃延伸7 min。使用PE480 PCR仪。

1.5 RAPD反应产物的检测

扩增后每反应管加5 μL Loading Buffer，混匀、取10～15 μL于1.4%琼脂糖凝胶2.5 V/cm电泳3～4 h。用STRATAGENE Eagle EyesⅡ扫描成像。

1.6 数据统计和分析

将RAPD扩增的带转换成0/1数据，用RAPDPLOT以及PHYLIP3.5c程序中的NEIGHBOR进行5个种群所有个体的UPGMA聚类分析；用RAPDDIST以及PHYLIP3.5c程序中的NEIGHBOR和CONSENSE进行3个亚种的UPGMA聚类分析及Bootstrip分析。

2 结果和讨论

2.1 飞蝗总DNA的抽提结果

尽管RAPD分析时对模板要求不是很高，但仍需要高分子量的模板。Henry *et al*.（1990）介绍了一种抽提昆虫高分子量DNA的方法，但此方法对抽提条件要求较严格。我们曾用长期贮存的干标本抽提总DNA，抽提产物电泳呈弥散状，RAPD结果也呈弥散状，这可能是干标本在长期储存中DNA严重降解所致。因此，我们认为飞蝗干标本不适合用于RAPD分析，也许长时间贮存的所有昆虫干标本都不适合用于RAPD分析。改用活标本及浸泡在无水或95%乙醇中－20℃（短期贮存）或－80℃（长期贮存）冷冻的标本都可得到质量较好的总DNA。研磨比较充分的标本可以获得较高的DNA产量。沉淀DNA用Tip头挑出，可以减少DNA中的小分子DNA片断及RNA，有利于RAPD的可重复性（Micheli *et al*.，1994）。用该方法可从1头雄成虫和1头雌成虫中分别得到50和100 μg左右的总DNA，DNA OD_{260}/OD_{280}在1.5～2.2，大小为45 kb左右，完全可以满足RAPD、构建基因组文库、PCR扩增rDNA、mtDNA以及微卫星序列对模板质量和数量要求，如图1。

2.2 RAPD条件的摸索

2.2.1 Taq酶的选择　不同厂家生产的Taq酶，其酶来源、抽提技术、酶活性测定条件和单位定义不同，因而酶活性可能也不相同，会对RAPD的结果产生一定的影响。Williams *et al*.（1993）用从*T.flavus*与*T.aquaticus*中分离的聚合酶扩增出不同的带型。Schierwater *et al*.（1993）比较了13种商业性的聚合酶，发现从*T.aquaticus*分离的所有聚合酶扩增出相似但不完全相同的带型，而所有其他来源的聚合酶（除了从*T.aquaticus*分离的Tfl聚合酶外）扩增出很少或分离不清的带。陈永久等（1997）用两种Taq酶进行试验，RAPD结果也有差异。我们曾试用7个厂家的Taq酶，多数酶不能扩增出产物，有的酶扩增后甚至在对照中也有明亮的带。改变反应体系中的所有成分（Taq酶除外），污染仍然存在，说明Taq酶是污染源。因此，试验时若发现对照中有非人为的污染或是无论如何试验也没有PCR产物，就应考虑更换其他来源的Taq酶。另外，根据我们的一些实验结果，即使同一厂家不同批次的酶活性也可能存在差异，扩增的带型有所不同，为了获得一致的扩增带型，试验前最好计划一次性购买Taq酶。

反应中Taq酶的浓度对RAPD的反应也有影响。增加聚合酶浓度可增加扩增的带数，50 μL反应体积中含有2.5 U酶时会扩增出非专一性的片断（Devos *et al*.，1992）。在我们的试验中，随着酶量（北农大产）的增加，扩增的带的亮度也增加，背景也增强。扩增大分子的带的亮度减弱，小分子的带亮度增强。Taq酶量在一定的范围内（1～2 U），RAPD带型基本不变。我们选用1 U的酶量。

2.2.2 模板DNA浓度对RAPD的影响　模板DNA对RAPD反应结果有较大的影响，不仅其纯度而且其浓度都可能影响到RPAD的结果。

不同的DNA抽提方法产生不同纯度的DNA。Micheli *et al*.（1994）发现乙醇沉淀离心的DNA是

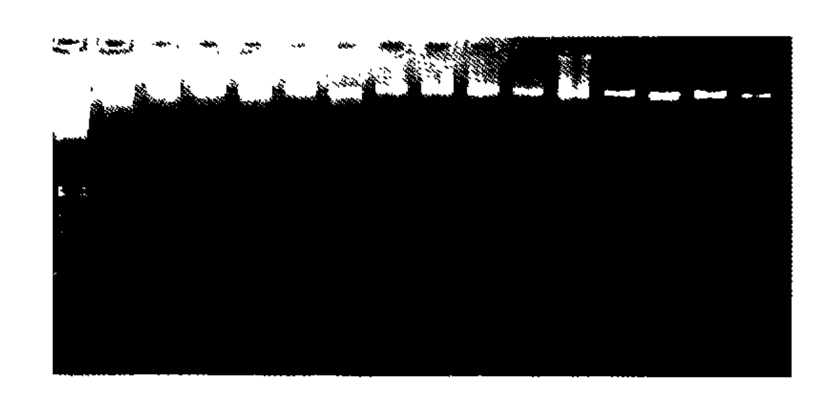


图 1 飞蝗总 DNA 的抽提结果

Fig.1 Results of extracted total DNA from locusts

从左到右：λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ、3 个飞蝗亚种 14 头个体抽提到的总 DNA，未酶切的 λDNA（from left to right：λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ、the DNAs extracted from 14 individuals of 3 subspecies，uncut λDNA，respectively）。



图 2 不同 DNA 浓度 RAPD 的结果

Fig.2 The RAPD profile amplified with different template concentrations

从左到右：λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ，1、10、20、40、60、80、100 ng 模板 DNA 扩增结果（from left to right：λDNA/*Hin*dⅢ + *Eco*RⅠ，results amplified with 1、10、20、40、60，80，100 ng template DNA，respectively）。

RAPD 不可重复的主要原因之一。而用玻璃棒缠绕出的 DNA 比用离心收集的 DNA 具有较高的重复性。他们认为，其离心沉淀过程中沉淀了包括分子量很低的 DNA/RNA 的污染物，在某种程度上干扰模板引物复合物的形成，从而影响 RAPD 的扩增带型。汪小全等（1996）发现模板中的 RNA 和一定量的蛋白质对 RAPD 扩增没有影响，而抽提模板时，残留的氯仿、SDS、CATB、异丙醇因影响 Taq 酶活性而常常影响扩增结果。本实验也发现 RNA 对扩增没有影响，去除 RNA 是为了防止其潜在的影响。

许多研究者研究了模板 DNA 浓度对 RAPD 的影响。太少的模板 DNA 得到不稳定的带型，太多的 DNA 可产生非专一性的带（Devos *et al*.，1992）或者产生弥散状、不清楚的带。为了获得可重复和较强的 RAPD 带，有必要优化模板 DNA 的量（Williams *et al*.，1993）。Hardrys *et al*.（1993）对每一引物和模板组合都根据经验调节模板 DNA 的浓度。Devos *et al*.（1992）发现模板DNA在0.1～100 ng 的浓度范围内，10～20 ng 的 DNA 与 0.2 μmol/L 的引物配合，可产生可重复性的带型。Chapco *et al*.（1992）在 100 μL 反应体积中，使用 70～100 ng 的模板 DNA，即使用 375 ng 的 DNA 也能够得到清楚分离的带型，但用扩增产物为模板时结果都呈弥散状。

鉴于上述原因，在试验时需要先确定模板的浓度，并对每一个引物的扩增应使模板浓度保持一致。我们将模板稀释成 7 种浓度进行扩增，扩增的结果是：模板浓度在一定范围内扩增的带型基本不变，但模板浓度过低时扩增无产物；模板浓度很高时，背景加强，出现弥散状（图 2）。试验中我们选用 20 ng 左右的模板。由此可以推断：如果试验中扩增无带，那么模板浓度可能过低；如果扩增结果背景很强或是呈弥散状，那么模板浓度可能过高。实验中还发现某种模板浓度对某些引物是优化的，而对其他引物来说可能不是最适合的。因此扩增前后调整模板浓度对扩增出漂亮的带型是很重要的。

2.2.3 不同 PCR 仪对 RAPD 的影响 不同实验室 RAPD 带型不具重复性的另一原因之一是因为使用的 PCR 仪器不同。PCR 仪器对 RAPD 影响的原因可能是由于不同的仪器升温降温的速度不同，温度控制的精细程度不同。有人比较了有标准加热模块的机器与毛细管热循环仪，发现毛细管循环仪的效果更好（Black *et al*.，1995）。陈永久等（1997）也试验证明不同的仪器对 RAPD 的结果有影响。Pornkulwat *et al*.（1998）比较了 PE 公司 3 种不同型号仪器的扩增效果，发现扩增带型有一定的变化。

我们用 3 种进口 PCR 仪（Barnstead 公司的

Thermolyne Amplitron Ⅰ；Techne 公司的 Cyclogene 和 Perkin-Elmer 公司的 PE480）进行试验，扩增效果有一定的差异。表现在某些带的亮度不一，某些弱带的有无。因此，在 RAPD 试验时，为了使实验结果能够重复稳定，需要选择合适的仪器、并且在整个实验过程中始终使用一种仪器。

2.2.4　不同反应管对 RAPD 反应的影响　用一种薄壁管（Biocon 公司产品）及 3 种普通厚壁管进行试验，发现反应管对 RAPD 扩增的结果影响不是很大，扩出的带型基本不变。但是在使用某些引物时（例如 OPA5），不同的反应管对某些弱带的亮度会有一定的影响，薄壁管对某些弱带的扩增优于厚壁管。因此，为了能够使实验结果具有可比性，在实验中需要自始至终使用同一种反应管。

2.2.5　dNTP、引物浓度对 RAPD 的影响　常规 PCR 反应所需的 dNTP 一般在 20～200 μmol/L，引物在 0.1～0.5 μmol/L。RAPD 反应中引物浓度较低时，可能会因扩增产物量少而检测不到；引物浓度较高时，又会产生弥散状的带（Williams *et al*., 1993）。Fani *et al*.（1993）的杂交实验也证明了随着引物浓度的降低，杂交信号的强度也降低。另外对某些引物是优化的反应条件对另外一些引物可能不是最好的。Devos *et al*.（1992）发现用某一引物优化的模板浓度并非对其他引物是优化的。

我们分别用 4 种浓度的 dNTP（在 25 μL 的反应体积中分别加 2.5 mmol/L 的 dNTP0.5、1、1.5 和 2.0 μL）和 4 种浓度的引物（在 25 μL 的反应体积中分别加 5 μmol/L 引物 0.5、1、1.5 和 2.0 μL）进行试验，发现随着 dNTP 浓度的增加，扩出带的亮度有所增加，背景也有所增强；而随着引物浓度的增加，扩增出带的亮度增加不很明显。随 dNTP 与引物浓度的增加，扩增的带型基本不变。我们选用 dNTP 和引物的最佳浓度是 0.1 和 0.2 μmol/L。

2.2.6　引物的筛选　Roehrdanz *et al*.（1993）讨论了如何筛选引物，首先选择使用的是那些能够扩增出适量而清楚带的引物，而不是那些扩增产物中有许多弱带、难分清的带或者很少带的引物。在实验中，如果引物扩增出许多条带而带型又非常复杂难以计数，这样的引物可以去掉（Schnell *et al*., 1996）。我们筛选引物时，首先用 1 个优化好浓度的 DNA 模板在同样条件下对所有引物进行 RAPD 反应，扩增结果较好的引物则留作以后使用，无结果或是始终呈弥散状的引物则被排除。然后用筛选出的引物对所有样本进行 RAPD 反应。本试验通过对 Operon 公司生产的 A、B 两组 40 个引物进行筛选，从 A 组中筛选出 5 个（POA1、8、12、15、17），B 组中筛选出 8 个引物（POB3、7、11、12、13、15、19、20）用来进行飞蝗不同地理种群 DNA 多型性的研究。本试验还发现 RAPD 扩增带型取决于引物的序列，合成一个与引物 POB19 只差一个碱基的引物 B'19，二者扩增的带型完全不同。

2.2.7　RAPD 反应　经过上述各种条件的摸索，找出了各反应成分合适的种类和浓度。根据反应管数，将多于反应管数几管的 Buffer、dNTP、引物和酶振荡混合，分装后进行 PCR 扩增，这样不至于最后不够分装。为了使试验结果是在同样条件下得到的，建议在 RAPD 分析之前，根据优化反应条件计划购买足够的 Taq 酶、dNTP、引物，同时每一个引物的 RAPD 反应试验条件必须一致，所有个体需在同一条件下进行反应，这样得出的结果才具有

表 1　5 个飞蝗种群间的遗传距离

Table 1　Genetic distance among five locust populations

	西藏飞蝗（拉萨）	西藏飞蝗（日喀则）	亚州飞蝗（巴盟）	群居型东亚飞蝗	散居型东亚飞蝗
西藏飞蝗（拉萨）	0				
西藏飞蝗（日喀则）	0.0516	0			
亚州飞蝗（巴盟）	0.1086	0.1036	0		
群居型东亚飞蝗	0.1238	0.1082	0.0860	0	
散居型东亚飞蝗	0.1558	0.1257	0.1098	0.0438	0

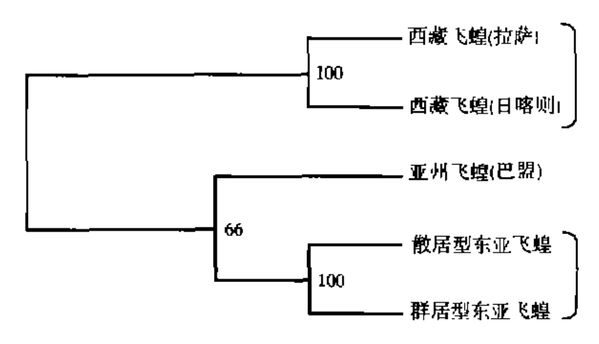


图 3　3 个飞蝗亚种的 UPGMA 聚类图

Fig.3　UPGMA Phenogram of three locust subspecies produced by RAPDDIST and the NEIGHBOR on PHYLIP 3.5c

图中数字是随机抽样 100 次的 Bootstrap 值（numbers are bootstrapping indices of 100 replicates of the level of support for individual nodes）。

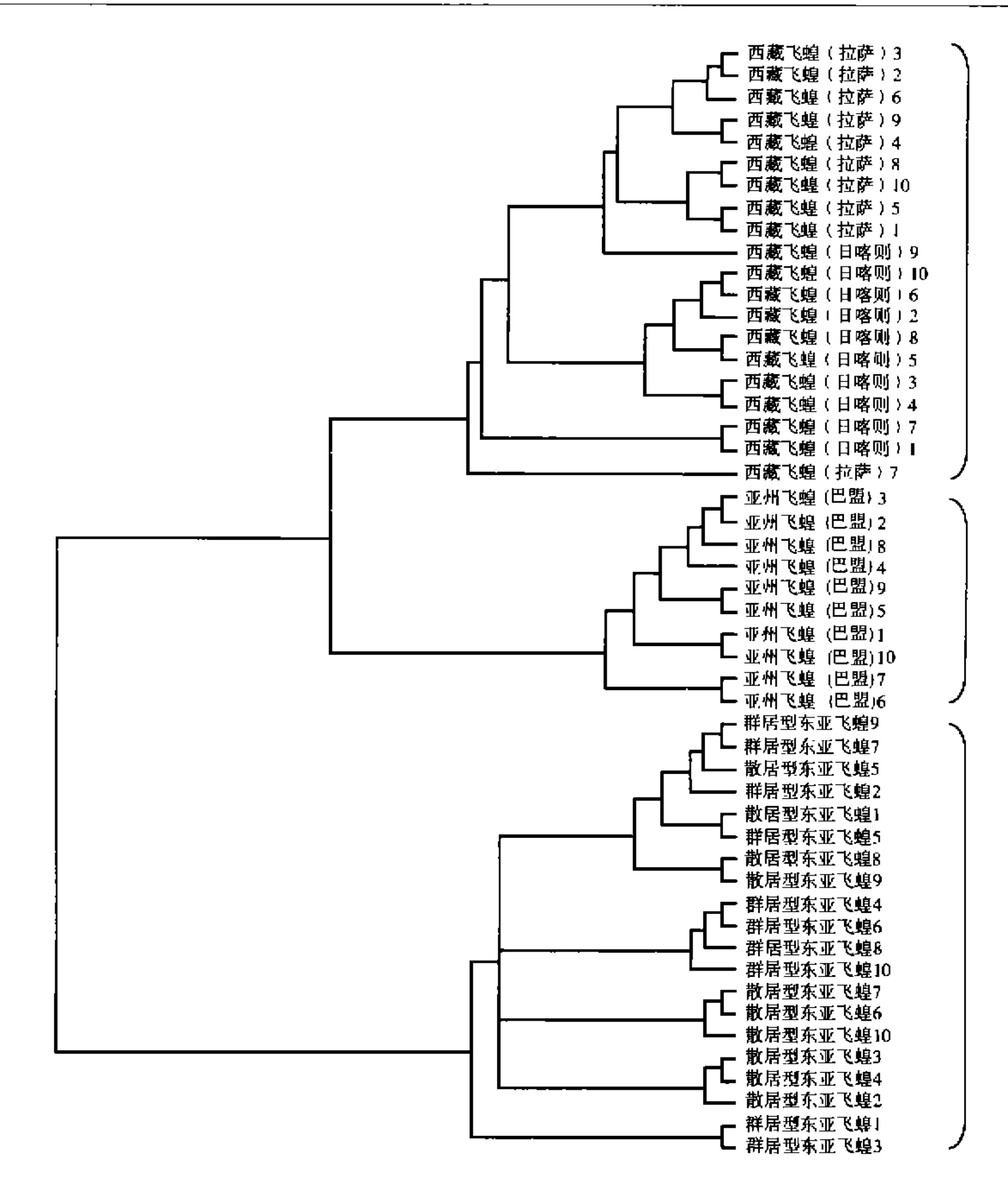


图 4 3个飞蝗亚种5个种群个体的 UPGMA 聚类图

Fig.4 UPGMA phonogram of all three subspecies individuals produced by RAPDPLOT and the NEIGHBOR on PHYLIP 3.5c

可比性。

2.2.8 RAPD 技术对我国飞蝗3个亚种亲缘关系的分析 按照优化条件对我国5个飞蝗种群进行 RPAD 分析，其遗传距离见表1，用遗传距离做出3个亚种的聚类图（图3）。在表1中亚种内的种群之间的遗传距离比亚种间种群的遗传距离要小，例如东亚飞蝗群居型与散居型的遗传距离为0.0438。散居型东亚飞蝗与西藏飞蝗（拉萨）和西藏飞蝗（日喀则）种群的遗传距离分别是0.1558、0.1257；与亚洲飞蝗巴盟种群的遗传距离为0.1098。这在图3中表现为：群居型和散居型东亚飞蝗种群聚在一起（Bootstrap 的值为100%，即对数据进行100次随机抽样得到的聚类图中，有100个聚类图与我们得到的图相同）；西藏飞蝗的2个种群聚在一起（Bootstrap 的值为100%）。总之聚类图中亚种内的种群全部聚类在一起，组成独立的分支，说明我国飞蝗3个亚种有较明显的区别。亚洲飞蝗种群与西藏飞蝗的2个种群的 Bootstrap 值仅为66%，说明它即可

与东亚飞蝗也可与西藏飞蝗聚类在一起。

在 3 个亚种 5 个种群所有个体的聚类图中（图 4），西藏飞蝗 2 个种群的个体全部聚在一起组成一个独立分支，2 个种群的个体混合聚类，说明 2 个种群之间存在基因交流；群居型和散居型东亚飞蝗 2 个种群的个体全部聚类在一起，形成 5 个亚组，两型飞蝗的个体混合聚类，同样说明 2 类型之间存在基因交流；亚洲飞蝗巴盟种群的个体全部聚类在一起形成一个分支。因此，3 个亚种及其地理种群之间存在着密切的关系，即可以划分出亚种也可以说明地理种群之间也存在基因交流，为进一步分析飞蝗地理种群的关系奠定了基础。今后需要更大量的取样和应用更多的引物进行分析，同时还需要利用其他分子生物学技术进行验证。

3 结　论

3.1 为了获得分子量较大、质量较好的产物，抽提飞蝗总 DNA 时，最好不用离心沉淀，而是将沉淀用灭菌的玻璃棒或 Tip 头挑出。

3.2 RAPD 扩增时，每一个引物扩增所有个体需要在同一条件下进行，这样得到的结果可能更具有可比性。

3.3 用 RAPD 技术研究我国飞蝗亲缘关系，可以得出亚种间种群的遗传距离比亚种内的遗传距离要大，3 个亚种之间有较明显的差异，此结果与形态学的结论相类似，说明 RAPD 技术可以用来解决昆虫学中的某些问题。

一般认为 RAPD 是一种简单而快速的技术，但是由于 RAPD 的结果对反应条件的改变较敏感，在实际操作中，需要认真细致地工作才能取得较好的结果。同样也还有许多实际问题需要解决。

参　考　文　献

Black I V W C, 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care[J]. *Insect Mol. Biol.*, 2(1): 1 - 6.

Black S F, Gray D I, Fenion D R *et al*, 1995. Rapid RAPD analysis for distinguishing *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes using a capillary air thermal cycler[J]. *Letter in Applied Microbiology*, 20: 188 - 190.

Chapco W, Ashton N W, Martel R K B *et al*, 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers[J]. *Genome*, 35: 569 - 574.

Chen Y J, Zhang Y P, 1997. Studies on factors in random amplified polymorphic DNA analysis[J]. *Zool. Res.*, 18(2): 221 - 227. [陈永久，张亚平，1997. 随机扩增多态 DNA 影响因素的研究. 动物学研究，18(2): 221 - 227.]

Cooper S J B, Hewitt G M, 1993. Nuclear DNA sequence divergence between parapatric subspecies of the grasshopper *Chorthippus parallelus*[J]. *Insect Mol. Biol.*, 2(3): 185 - 194.

Devos K M, Gale M D, 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat[J]. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 567 - 572.

Fani R, Damiani G, Di Serio *et al*, 1993. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms[J]. *Mol. Ecol.*, 2: 243 - 250.

Hardrys H, Schierwater B, Dellaporta S L *et al*, 1993. Determination of paternity in dragonflies by RPAD fingerprinting[J]. *Mol. Ecol.*, 2(2): 79 - 87.

Henry J M, Raina A K, Ridgway R L, 1990. Isolation of high-molecular-weight DNA from insects[J]. *Analytical Biochem.*, 185: 147 - 150.

Kang L, Li H J, Chen Y L, 1989. Analyses of numerical character variations of geographical populations of *Locusta migratoria* phase *solitaria* in China[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 32(4): 418 - 426. [康　乐，李鸿昌，陈永林，1989. 中国散居型飞蝗地理种群数量性状变异的分析. 昆虫学报，32(4): 418 - 426.]

Kang L, Chen Y L, 1991. The analysis of numerical taxonomy to the inter relationships among different geographic populations of *Locusta migratoria* (L.) phase *solitaria* (Orthoptera, Acrididae)[J]. *Sinozoologia*, 8: 71 - 82. [康　乐，陈永林，1991. 散居型飞蝗地理种群相互关系的数量分析. 动物学集刊，8: 71 - 82.]

Micheli M R, Bova R, Pascale E *et al*, 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method[J]. *Nucl. Acid. Res.*, 22(10): 1921 - 1922.

Pornkulwat S, Skoda S R, Thomas G D *et al*, 1998. Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae)[J]. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 91(5): 719 - 725.

Roehrdanz R L, Flanders R V, 1993. Detection of DNA polymorphisms in predatory Coccinellids using polymerase chain reaction and arbitrary primers (RAPD-PCR)[J]. *Entomphaga*, 38(4): 479 - 491.

Schierwater B, Ender A, 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products[J]. *Nucl. Acid. Res.*, 21(19): 4647 - 4648.

Schnell R J, Madiera P M, Hennessey M K *et al*, 1996. Inheritance of random amplified polymorphic DNA markers in *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae)[J]. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 89: 122 - 128.

Wang X Q, Zou Y P, Zhang D M *et al*, 1996. Problems in the use of RAPD to the study of genetic diversity and systematics[J]. *Acta Botanica Sinica*, 38(12): 954 - 962. [汪小全，邹喻苹，张大明等，1996. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报，38(12): 954 - 962.]

Welsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucl. Acid. Res.*, 18(24): 7213 - 7218.

Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al*, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucl. Acid. Res.*, 18(22): 6531 - 6535.

Williams J G K, Hanafey M K, Rafalski J A *et al*, 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers[J]. *Methods En-*

zymol., 218: 705 - 740.

Extraction of Total DNA from Locusts and Optimization of Reaction Conditions for RAPD Analysis

ZHANG Min-Zhao KANG Le

(*Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100080, *China*)

Abstract: In this study, we had developed a fast and easy method to extract total DNA from migratory locusts. We could extract about 50 μg and 100 μg DNA from single male and female individual respectively. The extracted total DNA was about 45 kb in length with OD_{260}/OD_{280} between 1.5 and 2.2, which could satisfy the requirements of RAPD and PCR on DNA template. In order to obtain high-molecular-weight DNA from migratory locusts and repeatable RAPD results, we used autoclaved tips to collect precipitated DNA after being extracted with phenol/chloroform instead of collecting by centrifugation. We tested experimental conditions including different PCR amplifiers, tubes and concentrations of template DNA, Taq DNA polymerase, dNTP and primer that might affect RAPD results. Within some limits, the concentrations of template DNA, Taq DNA polymerase, dNTP and primer did not greatly affect RAPD profiles. The optimized reaction conditions of RAPD for three Chinese locust subspecies in 25 μL reaction volume were as follows: 20 ng template DNA, 0.1 mol/L dNTP, 0.2 μmol/L primer, 1 U Taq polymerase. Some advice was also given, especially all individuals of all populations should be amplified with every primer at the same reaction conditions. With the optimized reaction conditions for RAPD, we analyzed the genetic relationship among three locust subspecies in China. The genetic distances generated by RAPDDIST between populations belonging to the same subspecies were less than those to different subspecies. In the UPGMA Phenogram of three locust subspecies, the two populations of *L.m.manilensis* and *L.m.tibetensis* were clustered together with a bootstrap of 100%, respectively. The Bameng population of *L.m.migratoria* was clustered with two populations of *L.m.manilensis* with a bootstrap of 66%, meaning that the Bameng population of *L.m.migratoria* could also clustered with *L.m.tibetensis*. In the UPGMA Phenogram of all individuals of three subspecies, all individuals of one subspecies were clustered together to form a branch, so three subspecies were significantly different in DNA polymorphism. Thus, RAPD method could be used to separate the three subspecies. There was a gene flow between the populations of *L.m.tibetensis* and *L.m.manilensis*. In order to get the true relationships among the three subspecies, more samples and primers should be used in the analysis on the three locust subspecies with RAPD, and other molecular techniques should be applied to test the results of RAPD.

Key words: Migratory locust; Extraction of total DNA; RAPD optimization; Population genetic